

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 10 月 10 日 (10.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/079253 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/82, A61K 38/00, 39/00, A61P 35/00, C07K 7/04, C12N 5/06
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/02794
- (22) 国際出願日: 2002 年 3 月 22 日 (22.03.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-83250 2001 年 3 月 22 日 (22.03.2001) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒562-0036 大阪府箕面市船場西 2-1 9-3 0 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: WTI MODIFIED PEPTIDE

(54) 発明の名称: WT 1 改変ペプチド

(57) Abstract: A cancer antigen peptide containing the following amino acid sequence Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO:3); a vaccine for cancer containing the same as the active ingredient; and a DNA vaccine containing a DNA encoding this peptide as the active ingredient.

(57) 要約:

次のアミノ酸配列 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 3) を含んで成る癌抗原ペプチド、及びこれを有効成分とする癌ワクチン、並びにこのペプチドをコードする DNA を有効成分とする DNA ワクチン。

WO 02/079253 A1

明 細 書

W T 1 改 変 ペ プ チ ド

発 明 の 分 野

本発明は、W i l m s 腫瘍の癌抑制遺伝子 W T 1 の産物に基づく癌抗原に関する。この癌抗原は、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、又は固形癌、例えば胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等、並びにさらには W T 1 を発現するすべての癌に対する抗癌ワクチンとして有用である。

背 景 技 術

異物を排除するための免疫機構には、一般に、抗原を認識して抗原提示細胞として機能するマクロファージ、該マクロファージの抗原提示を認識して種々のリンホカインを産生して他の T ー細胞等を活性化するヘルパー T ー細胞、該リンホカインの作用により抗体産生細胞に分化する B ーリンパ球等が関与する液性免疫と、抗原の提示を受けて分化したキラー T ー細胞（細胞傷害性 T 細胞（C T L）とも称する）が標的細胞を攻撃し破壊する細胞性免疫とがある。

現在のところ、癌の免疫は主として、キラー T ー細胞が関与する細胞性免疫によるものと考えられている。キラー T ー細胞による癌免疫においては、主要組織適合抗原（Major Histocompatibility Complex ; MHC）クラス I（MHC クラス I 抗原、ヒトの場合は H L A 抗原と呼ばれる）と癌抗原との複合体の形で提示された癌抗原を認識した前駆体 T ー細胞が分化増殖して生成したキラー T ー細胞が癌細胞を攻撃し、破壊する。この際、癌細胞は MHC クラス I 抗原

と癌抗原との複合体をその細胞表面に提示しており、これがキラー T-細胞の標的とされる (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev, 146, 167, 1995)。

標的細胞である癌細胞上に MHC クラス I 抗原により提示される前記の癌抗原は、癌細胞内で合成された抗原蛋白質が細胞内プロテアーゼによりプロセッシングされて生成した約 8 ～ 12 個のアミノ酸から成るペプチドであると考えられている (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995)。

現在、種々の癌について抗原蛋白質の検索が行われているが、癌特異抗原として証明されているものは少ない。

Wilms 腫瘍の癌抑制遺伝子 WT1 (WT1 遺伝子) は、Wilms 腫瘍、無紅彩、泌尿生殖器異常、精神発達遅滞などを合併する WAGR 症候群の解析から Wilms 腫瘍の原因遺伝子の 1 つとして染色体 11p13 から単離された (Gessler, M. ら、Nature, Vol. 343, p.774-778(1990)) ものであり、ゲノム DNA は約 50 kb で 10 のエクソンから成り、その cDNA は約 3 kb である。cDNA から推定されるアミノ酸配列は、配列番号: 1 に示す通りである (Mol. Cell. Biol., 11, 1707, 1991)。

WT1 遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞を WT1 アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平 9-104627 号公報) ことなどから、WT1 遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT1 遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特願平 9-191635)、WT

1 遺伝子は白血病及び固形癌における新しい腫瘍マーカーであることが判明した。

WO 00/06602 には、WT 1 遺伝子発現生成物の部分から成る幾つかの癌特異抗原ペプチドが記載されており、その内の有望なものとして D^b と称し、次のアミノ酸配列：Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)(本発明において「WT 1 ワイルドペプチド」と称する)が記載されている。

発明の開示

従って、本発明は、すでに知られている癌特異抗原ペプチドに比べてより活性が高く、癌ワクチンとして有望なペプチドを提供しようとするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、すでに知られている上記のアミノ酸配列(配列番号：2)の2番目のアミノ酸MetをTyrに変更したアミノ酸配列：Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)を有するペプチド(「WT 1 改変ペプチド」と称する)がより高い活性を有することを見出し、本発明を完成した。

従って本発明は、次のアミノ酸配列：Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)を含んで成り、9～30個のアミノ酸から成るペプチド(WT 1 改変ペプチド)を提供する。配列番号：3に示すアミノ酸配列を含む、9～12個のアミノ酸からなるポリペプチドが好ましく、配列番号：3に示すアミノ酸配列から成るペプチドがさらに好ましい。

本発明はさらに、上記のWT 1 改変ペプチドを有効成分とする癌ワクチンを提供する。

本発明はさらに、上記のペプチドをコードするDNAを有効成分

とする、癌に対するDNAワクチンを提供する。

本発明はさらに、HLA抗原（MHCクラスI抗原）と上記ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞を提供する。

本発明はさらに、HLA抗原と上記ペプチドとの複合体を認識する細胞傷害性T細胞を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、WT1ワイルドペプチド（配列番号：2）又は本発明のWT1改変ペプチド（配列番号：3）により刺激されたエフェクター細胞（E）による、ペプチドでパルスされているか又はパルスされていないC1R2402標的（ターゲット）細胞（T）の殺細胞効果（比細胞溶解活性）を示すグラフである。図中、黒丸は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R2402標的細胞に対する、WT1改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、黒四角は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R2402標的細胞に対する、WT1ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、中空丸は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R2402標的細胞に対する、WT1改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、そして中空四角は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R2402標的細胞に対する、WT1ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示す。

図2は、WT1ワイルドペプチド又は本発明のWT1改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、内因性にWT1抗原を発現している急性骨髄性白血病細胞又は発現していない急性骨髄性白血病細胞に対する細胞溶解活性を示すグラフである。

図3は、W T 1 ワイルドペプチド又は本発明のW T 1 改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、ペプチドをパルスされているか又はパルスされていないC1R 2 4 0 2 標的細胞の殺細胞効果（比細胞溶解活性）を示すグラフである。図中、黒丸は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R 2 4 0 2 細胞に対する、W T 1 改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、黒四角は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R 2 4 0 2 標的細胞に対する、W T 1 ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、中空丸は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R 2 4 0 2 標的細胞に対する、W T 1 改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、そして中空四角は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R 2 4 0 2 標的細胞に対する、W T 1 ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示す。

図4は、W T 1 ワイルドペプチド又は本発明のW T 1 改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、内因性にW T 1 を発現している肺癌細胞株又は発現していない肺癌細胞株に対する細胞溶解活性を示すグラフである。

図5は、W T 1 ワイルドペプチド又は本発明のW T 1 改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、ワイルドペプチドをパルスされているC1R 2 4 0 2 標的細胞の殺細胞効果（比細胞溶解活性）に対する抗H L A クラス I 抗体、抗H L A クラス II 抗体、抗C D 8 抗体の阻害効果を示すグラフである。

発明の実施の形態

本発明のペプチドは、配列番号：3 に示す9 個のアミノ酸から成

るアミノ酸配列を含み、9～30個のアミノ酸から成るペプチドである。さらにHLA抗原に結合して提示されるという観点から、配列番号：3に示すアミノ酸配列を含み、アミノ酸9～12個から成るペプチドが好ましい。その際、HLA抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）を有するペプチドが、より好ましい（J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41:p178, 1995, J. Immunol., 155:p4307, 1994, J. Immunol., 155:p4749, 1995）。さらに、配列番号：3に示す9個のアミノ酸のアミノ酸配列から成るペプチドが最も好ましい。

なお、前記で「配列番号：3に示すアミノ酸配列を含むペプチド」とは、具体的には、例えば、配列番号：3に示すアミノ酸配列を含み、WT1（配列番号：1）上の該当位置（第235位～第243位）、又はヒトWT1（NCBIデータベースAccession No. XP012009）上の対応位置よりN末端方向及び／又はC末端方向に伸長したペプチドであって、かつ癌抗原ペプチドとしての活性を有するものが挙げられる。

本発明の癌抗原ペプチドの活性測定法としては、例えばJ. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の方法が挙げられる。以下、本方法の概略につき、HLAの型がHLA-A24の場合を例にとり説明する。まず、HLA-A24抗原陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離する。次に、この末梢血リンパ球に対してin vitroで本発明のペプチドを添加して刺激することにより、本発明のペプチドとHLA-A24との複合体の提示された抗原提示細胞を特異的に認識するCTL（細胞傷害性T細胞）を誘導する。

当該CTLの誘導は、例えば、抗原ペプチドとHLA-A24との複合体に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を、例えばELISA法によって測定することにより、調

ることができる。また、 ^{51}Cr やEuropiumで標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法 (^{51}Cr リリースアッセイ、Int. J. Cancer. 58, p317, 1994、Europiumリリースアッセイ、J. Immunol., 154, p3991, 1995) によっても調べることができる。さらに、後述の実施例を参考にして行うこともできる。

本発明はまた前記抗原を有効成分とする癌ワクチンに関する。このワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防又は治療のために使用することができる。特にこのワクチンは、HLA-A24陽性の患者に適用し得るものである。このワクチンは、経口投与、又は非経口投与、例えば腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与等により投与することができる。

さらに、本発明のワクチンの投与方法として、患者の末梢血から単核球を集め、その中から樹状細胞を取り出し、本発明のペプチドをパルスして患者に皮下投与などで患者に戻す方法も行われる。

本方法は、細胞療法、あるいはDC（樹状細胞）療法とも呼ばれるものであり、詳しくは後述の「抗原提示細胞」の項を参照されたい。

ワクチンは、前記有効成分としての投与ペプチドのほかに、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバンド (Clin-Micobiol. Rev., 7, 277-289, 1994)、例えば水酸化アルミニウムのごとき鉱物ゲル；リソレシチン、プルロニックポリオールのごとき界面活性剤；ポリアニオン；ペプチド；又は油乳濁液を含むことができる。あるいは、リポゾーム中へ混合し、又は多糖及び／又はワ

クチン中に配合される他の集合体を含むことができる。投与量は一般に、1日当たり0.1 μ g ~ 1 mg/kgである。

本発明ではまた、上記のポリペプチドワクチンをコードするDNAもワクチン（DNAワクチン）として使用することができる。すなわち、本発明のWT1改変ペプチドをコードする核酸を含有する核酸、好ましくはDNAを、適切なベクター、好ましくは発現ベクターに挿入した後、動物に投与することにより、癌免疫を生じさせることができる。このようなDNAワクチンの具体的手法については、WO 00/06602やJ. Immunol., 160, P1717, 1998などを参照されたい。

本発明はまた、HLA抗原と上記ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞に関する。実施例において、本発明のペプチド刺激により強いcell Killing活性が認められているが、これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチドとHLA抗原（HLA-A24抗原）との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この抗原提示細胞を特異的に認識するCTL（細胞傷害性T細胞）が誘導された結果に他ならない。このような、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞は、以下に述べるような細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

細胞療法において用いられる抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、この細胞に本発明のペプチドを体外でパルスして、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を細胞表面に提示させることにより作製される。ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示することの可能なHLA抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、抗原提示能が高いとされている樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞にパルスされる本発明のペプ

チドは、ペプチドの形態のみならず、当該ペプチドをコードするDNAやRNAの形態であっても良い。

本発明の抗原提示細胞の具体的な調製法としては、例えばCancer Immunol Immunother., 46: 82, 1998、J. Immunol., 158, p1796, 1997、Cancer Res., 59, p1184, 1999などを参考にすることができる。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に、本発明のペプチドをコードするDNAやRNAを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、例えばDNAの場合はCancer Res., 56: p 5672, 1996やJ. Immunol., 161: p5607, 1998などを参考にして行うことができ、またRNAの場合は、J. Exp. Med., 184: p 465, 1996などを参考にして行うことができる。

前記抗原提示細胞は、腫瘍の治療剤の有効成分とすることができる。その際、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。

本発明はさらに、HLA抗原と上記ペプチドとの複合体を認識する細胞傷害性T細胞(CTL)に関する。本発明のCTLは、以下の養子免疫療法において有効に用いられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている(J. Natl. Cancer. Inst., 86: 1159, 1994)。

またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチド T R P - 2 で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的な C T L を増殖させ、該 C T L をメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている (J. Exp. Med., 185: 453, 1997)。これは、抗原提示細胞の H L A 抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識する C T L をイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のペプチドを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的 C T L を増やした後、この C T L を患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

このように本発明の C T L は、腫瘍の治療剤の有効成分とすることができる。その際、C T L を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。

実施例

次に、実施例により、本発明のペプチドが癌抗原及び癌ワクチンとして有用なことを、明らかにする。

実施例 1.

H L A - A * 2 4 0 2 を有するヒトの末梢血単核球を分離し、これを 2 4 ウエルプレートに 2×10^6 細胞 / ウエルの量で分配し、これに W T 1 ワイルドペプチド又は W T 1 改変ペプチドを $20 \mu M$ の濃度になるように添加し、1週間培養した。この際の培地として、45% R P M I、45% A I V、10% F C S、1×非必須アミノ酸、S M / P C G を用いた。上記の培養の後、細胞を 2×10^6 細胞 / ウエルに調製し、レスポンドー (responder) 細胞とした。

他方、上記の同じ H L A - A * 2 4 0 2 のヒトから、別途、末梢

血単核球を分離し、前記それぞれ一方のペプチド $20 \mu\text{M}$ と共に 4 時間培養してペプチドパルスし、次に 30 Gy の放射線照射した後、細胞を 4×10^6 細胞/ウェルに調製し、スチムレーター (stimulator) 細胞とした。

上記のようにして調製したレスポonder細胞とスチムレーター細胞を混合し、さらに IL-2 を 50 U/ml の濃度で加えて 1 週間培養した。この結果、得られた細胞の状態は次の通りであった。

表 1

ペプチド	細胞数	CD4	CD8
WT1 ワイルドペプチド	2.4×10^6 / ウェル	5%	35%
WT1 改変ペプチド	3.0×10^6 / ウェル	18%	38%

次に、 ^{51}Cr リリース法に従って Killing assay を行った (J. Immunol. 164:1873, 2000)。標的細胞として、C1R2402 細胞、及び上記のペプチドでパルスした C1R2402 細胞を用い、これらのそれぞれの標的細胞 (T) に、上記の通りに WT1 ワイルドペプチド又は WT1 改変ペプチドにより刺激した細胞 (エフェクター細胞) (E) を、E : T 比 1、5 又は 20 において作用させ、細胞溶解を測定した。結果を図 1 に示す。この図から明らかな通り、WT1 ワイルドペプチドにより刺激した細胞に比べて WT1 改変ペプチドで刺激した細胞の方が強い cell killing 活性を示した。

実施例 2.

内因性 (endogeneous) に WT1 抗原を発現する白血病細胞 (標的細胞) に対する、WT1 ワイルドペプチド又は WT1 改変ペプチドにより刺激したエフェクター細胞の cell killing 活性を ^{51}Cr リリース法により試験した。標的細胞として WT1 + / A*2402 + 細胞 (#1 AML 患者の白血病細胞)、WT1 - / A*2402 +

細胞（#2 AML患者の白血病細胞）、WT1+/A*2402-細胞（#3 AML患者の白血病細胞）、及びWT1-/A*2402-細胞（#4 AML患者の白血病細胞）を用いた。

実施例1で調製したエフェクター細胞（E）と上記の標的細胞（T）とを、E/T比20:1で混合し、4時間培養し、細胞溶解の程度を測定した。結果を図2に示す。

この図から明らかな通り、WT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドにより刺激された細胞のいずれもWT1+/A*2402細胞に対して細胞毒性活性を示したが、その活性はWT1改変ペプチドの方が高かった。

実施例 3.

実施例1と同様の実験を別のHLA-A*2402陽性の健常人の末梢血単核球から調製したエフェクター細胞を用いて試験した。結果を図3に示す。

この図から明らかな通り、実施例1と同様にWT1ワイルドペプチドにより刺激した細胞に比べてWT1改変ペプチドにより刺激された細胞の方が強い細胞傷害活性を示した。

実施例 4.

WT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドで刺激したエフェクター細胞の内因性（endogeneous）にWT1抗原を発現する肺癌由来の癌細胞株（標的細胞）に対する細胞傷害活性を⁵¹Crリリース法に従って試験した。標的細胞としてRERF-LCAI（WT1+/A*2402+）、LC1sq（WT1+/A*2402+）、11-18（WT1-/A*2402+）、LK87（WT1+/A*2402-）を用いた。

実施例1と同様な方法により調製したエフェクター細胞（E）と⁵¹Crで標識した上記の標的細胞（T）とを、実施例2と同様にE

／T比20：1で混合して4時間培養し、細胞溶解の程度を測定した。結果を図4に示す。

この図から明らかな通り、WT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドにより刺激された細胞のいずれもWT1+／A*2402+の標的細胞に対してのみ細胞傷害活性を示したが、その活性はWT1改変ペプチドの方が高かった。

実施例 5.

WT1 ワイルドペプチド又はWT1 改変ペプチドで刺激したエフェクター細胞がHLAクラスIに拘束性のCD8陽性キラー細胞であることを抗体を用いたブロッキングアッセイにより確かめた。抗体としては、抗HLAクラスI抗体、抗HLAクラスII抗体、抗CD8抗体を用いた。実施例1と同様な方法により調製したエフェクター細胞(E)、⁵¹Crで標識したC1R2402又はWT1ワイルドペプチドをパルスしたC1R2402細胞を標的細胞(T)とし、E／T比20：1で抗体とともに混合して4時間培養し、⁵¹Crリリース法に従って細胞溶解の程度を測定した。結果を図5に示す。

この図から明らかな通り、WT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドにより刺激された細胞のいずれも抗HLAクラスI抗体及び抗CD8抗体により細胞傷害活性が阻害されており、細胞傷害活性を示す細胞は、HLAクラスIに拘束性のCD8陽性キラー細胞であることが示された。

実施例 6.

WT1 改変ペプチドとWT1ワイルドペプチドのHLA-A*2402への結合親和性を調べた。C1RA2402細胞を酸緩衝液(131mMクエン酸、66mMリン酸ナトリウム、290mosmol、pH3.3)で1分間処理した後、0.5%のウシ血清アルブミンを含むDMEM培養液を加えて中和した。細胞は、培養液で洗浄

した後、200 nMの β 2-マイクログロブリン（シグマ社）と0.5%のウシ血清アルブミンを含むDMEM培養液で 2×10^6 細胞/mlの濃度に懸濁した。15 μ lの細胞懸濁液を各種濃度のWT1ペプチドを含む50 μ lの培養液と混合し、室温で4時間インキュベートした。細胞は洗浄後、FITCで標識したHLA-A24に対するモノクローナル抗体（クローン名7A12）で染色し、フローサイトメーターFACSでHLA-A24発現量を解析した。同様の操作をHLA-A*2402に結合することが報告されているメラノーマ抗原のpmel 15の抗原ペプチド（Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu）（配列番号：4）（J. Immunol., 154:5994, 1995）についても行い、これをスタンダードとして、文献（Immunogenetics, 51:816, 2000）に記載の方法によりWT1ペプチドの解離定数（Kd）を算出した。結果を表2に示す。

表2

ペプチド	解離定数 Kd (M)
WT1ワイルドペプチド	1.82×10^{-5}
WT1改変ペプチド	6.40×10^{-7}

この表から明らかな通り、WT1改変ペプチドはWT1ワイルドペプチドよりもHLA-A*2402への結合親和性が強かった。

産業上の利用可能性

上記の結果から、本発明のペプチドは確かに癌抗原として機能し、癌細胞に対するキラーT-細胞（癌細胞傷害性T細胞）を誘導増殖させたことが立証された。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、WT1遺伝子の発現の上昇を伴う白血病及び固形癌に対する癌ワク

チンとして有用である。

請 求 の 範 囲

1. 次のアミノ酸配列：Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)を含み、9～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原ペプチド。

2. 配列番号：3に示すアミノ酸配列を含む9～12個のアミノ酸から成る、請求項1に記載の癌抗原ペプチド。

3. 配列番号：3に示すアミノ酸配列から成る、請求項1に記載の癌抗原ペプチド。

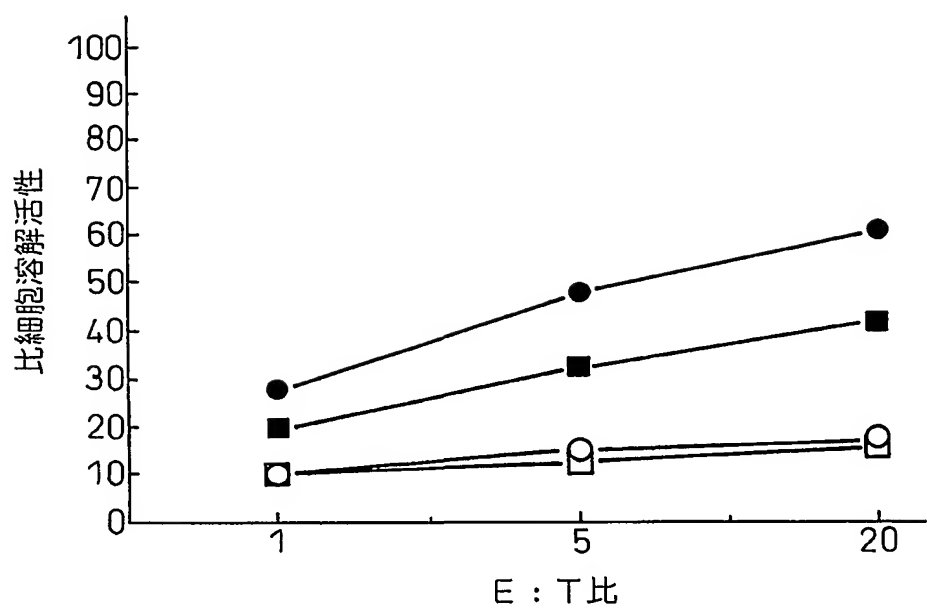
4. 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドを有効成分とする癌ワクチン。

5. 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドをコードするDNAを有効成分とする、癌に対するDNAワクチン。

6. HLA抗原と請求項1～3いずれか1項に記載のペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞。

7. HLA抗原と請求項1～3いずれか1項に記載のペプチドとの複合体を認識する細胞傷害性T細胞。

Fig.1



- [WT 1 改変ペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスC1R2402標的細胞
- [WT 1 ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスC1R2402標的細胞
- [WT 1 改変ペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスなしC1R2402標的細胞
- [WT 1 ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスなしC1R2402標的細胞

Fig.2

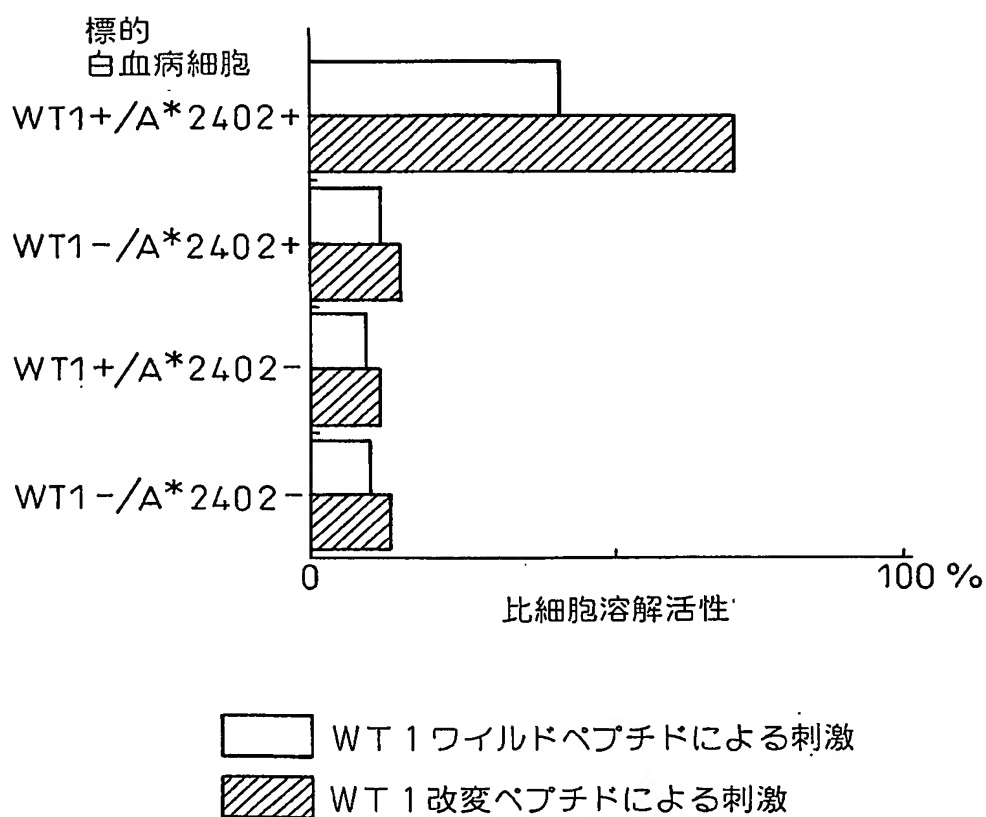
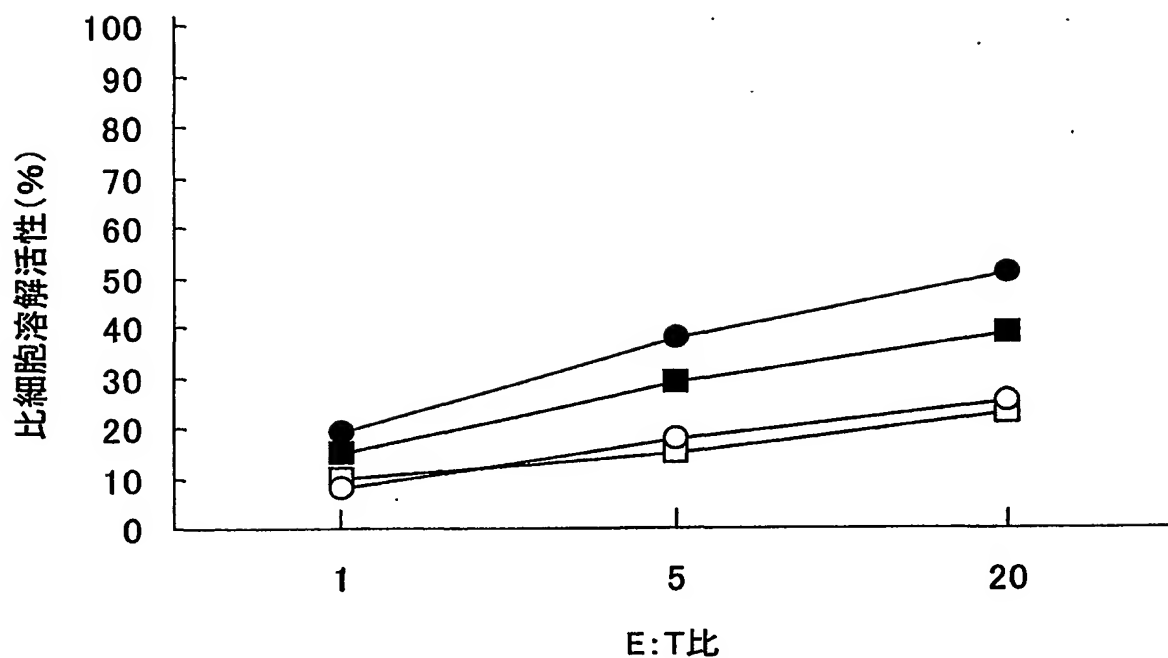


Fig.3



- [WT1 改変ペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスC1R2402標的細胞
- [WT1 ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスC1R2402標的細胞
- [WT1 改変ペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスなしC1R2402標的細胞
- [WT1 ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞
ワイルドペプチドパルスなしC1R2402標的細胞

Fig.4

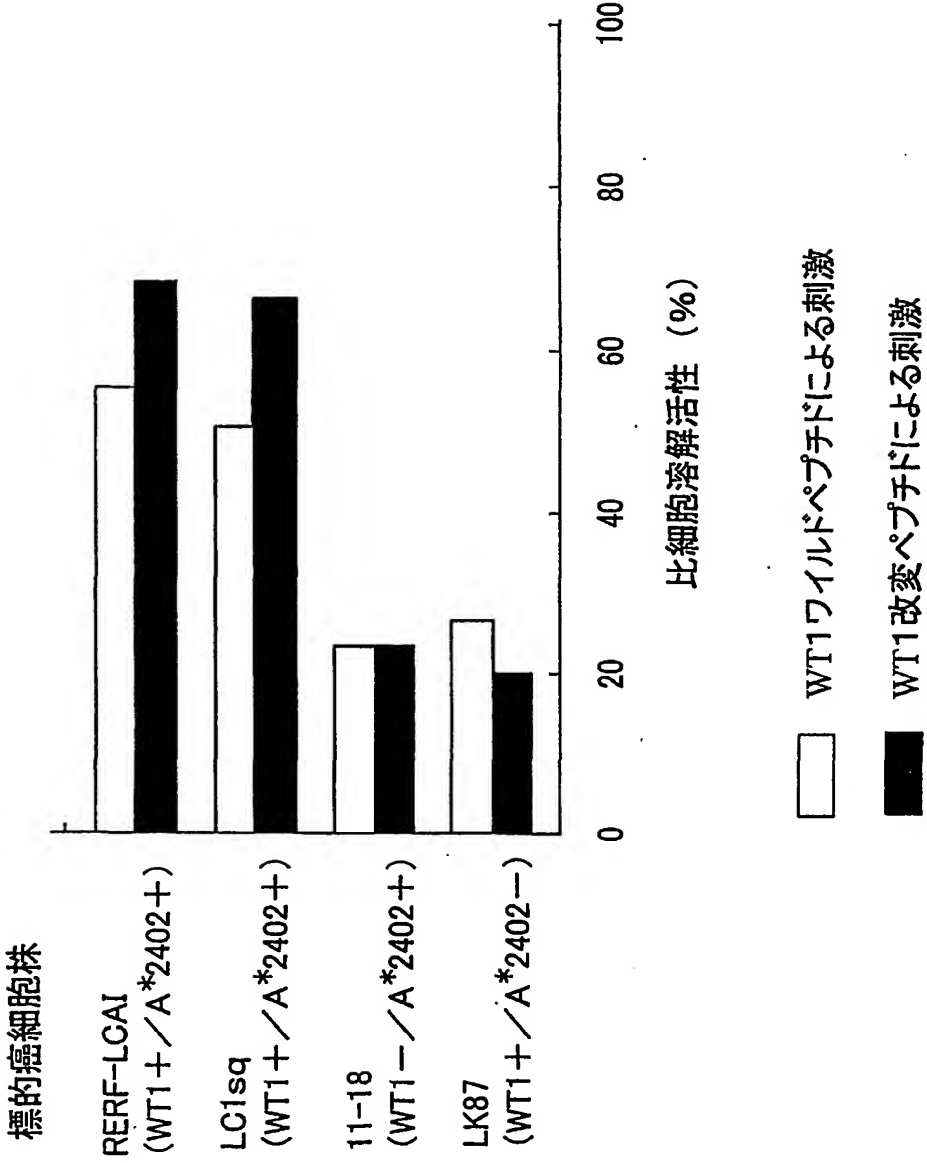
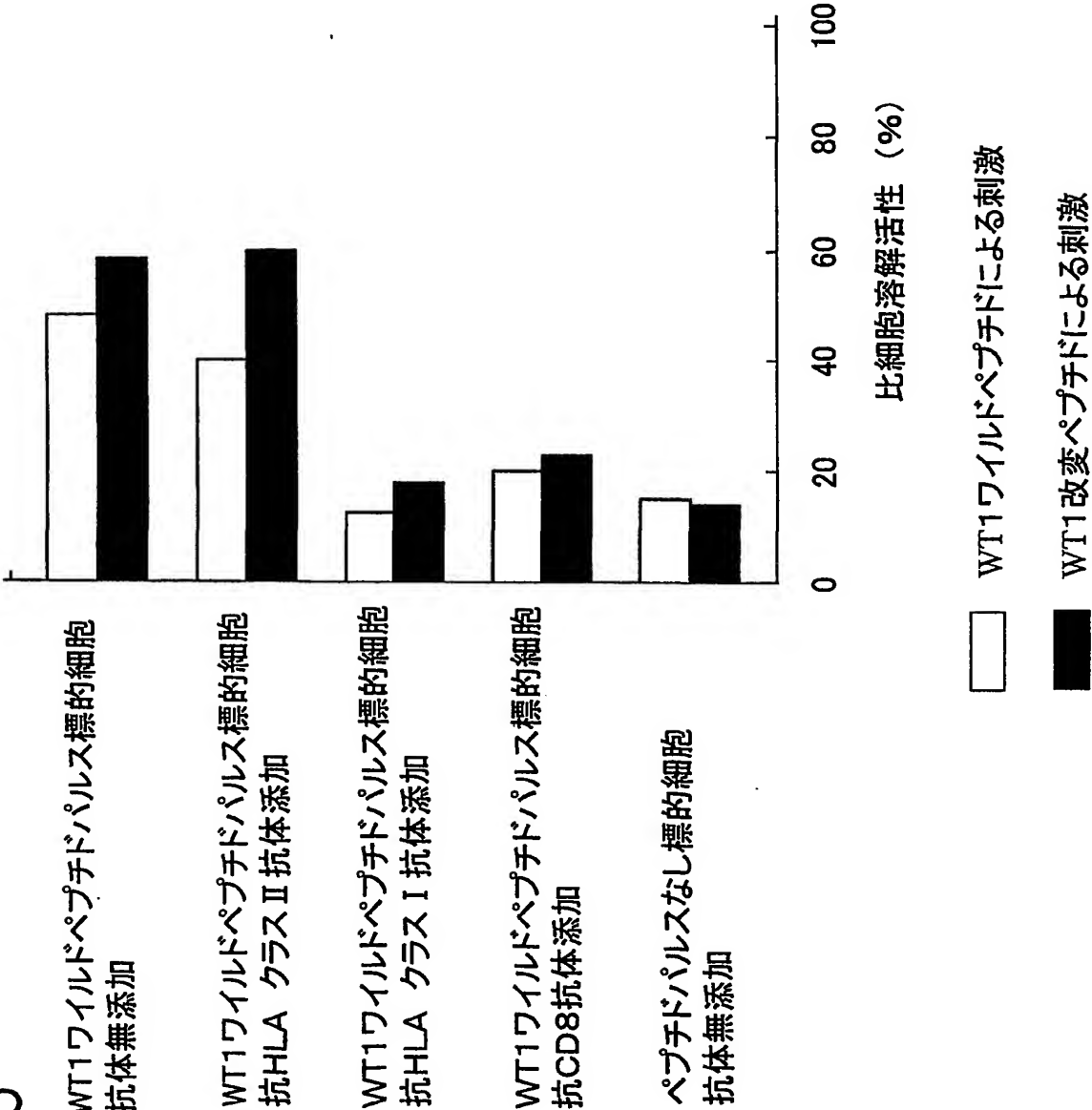


Fig.5



SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 >

< 1 2 0 > modified WT1 peptide

< 1 3 0 > J 9 3 9

< 1 5 0 > J P 2 0 0 1 - 8 3 2 5 0

< 1 5 1 > 2 0 0 1 - 0 3 - 2 2

< 1 6 0 > 4

< 2 1 0 > 1

< 2 1 1 > 4 4 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > M o u s e

< 4 0 0 > 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Ser

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro Val Ser Gly Ala

20

25

30

Arg Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala

35

40

45

Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro

50

55

60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly

65

70

75

80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe

85

90

95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe

100

105

110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125
Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Thr Ile
130 135 140
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr
145 150 155 160
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe
165 170 175
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
195 200 205
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu
260 265 270
Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
275 280 285
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser
290 295 300
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu His Val Ala
 435 440 445

Leu

449

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e

< 4 0 0 > 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5
< 2 1 0 > 3
< 2 1 1 > 9
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5
< 2 1 0 > 4
< 2 1 1 > 9
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > A n t i g e n i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 4

Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/82, A61K38/00, A61K39/00, A61P35/00, C07K7/04,
C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/82, C07K7/04, C12N5/06, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<input checked="" type="checkbox"/> A	WO 00/26249 A1 (Imperial College Innovations Ltd.), 11 May, 2000 (11.05.00), Claims & AU 9964797 A & EP 1127068 A1	<u>7</u> 1-6
<input checked="" type="checkbox"/> A	WO 00/18795 A2 (Corixa Corp.), 06 April, 2000 (06.04.00), Claims & AU 9964078 A & EP 1117687 A2 & BR 9914116 A & CN 1336935 A & NO 200101613 A & KR 2001085861 A & HU 200103598 A2	<u>7</u> 1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 June, 2002 (14.06.02)Date of mailing of the international search report
25 June, 2002 (25.06.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/02794

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/06602 A1 (Haruo SUGIYAMA), 10 February, 2000 (10.02.00), Full text & AU 9949321 A & BR 9912663 A & EP 1103564 A1 & JP 2000-562398 A & CN 1314916 A & KR 2001072112 A	1-7
A	OKA, Y. et al., Cancer Immunotherapy Targeting Wilms' Tumor Gene WT1 Product, J.Immunol. (2000) Vol.164, pages 1873 to 1880	1-7
A	Keiko TADOKORO, "Gan Yokusei Idenshi WT1 no Kino Hatsugen", Gendai Kagaku extra issue 33 "Gan Idenshi Kenkyu no Tenbo II" (1997), pages 92 to 98	1-7
A	WO 96/38176 A1 (Chuzo KISHIMOTO), 05 December, 1996 (05.12.96), Full text & AU 9657796 A & JP 9-104629 A & EP 841068 A1 & US 6034235 A	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/82, A61K 38/00, A61K 39/00, A61P 35/00, C07K 7/04, C12N 5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/82, C07K 7/04, C12N 5/06, C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 00/26249 A1 (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD) 2000.05.11, 特許請求の範囲 & AU 9964797 A & EP 1127068 A1	7 1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.06.02

国際調査報告の発送日

25.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

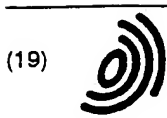
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 00/18795 A2 (CORIXA CORP) 2000. 04. 06, 特許請求の範囲 & AU 9964078 A & EP 1117687 A2 & BR 9914116 A & CN 1336935 A & NO 200101613 A & KR 2001085861 A & HU 200103598 A2	<u>7</u> 1-6
A	WO 00/06602 A1 (杉山治夫) 2000. 02. 10, 全文 & AU 9949321 A & BR 9912663 A & EP 1103564 A1 & JP 2000-562398 A & CN 1314916 A & KR 2001072112 A	1-7
A	OKA, Y. et al. Cancer Immunotherapy Targeting Wilms' Tumor Gene WT1 Product, J. Immunol. (2000) Vol. 164, p. 1873-1880	1-7
A	田所恵子、がん抑制遺伝子WT1の機能発現、現代化学増刊33 「がん遺伝子研究の展望II」(1997)第92-98頁	1-7
A	WO 96/38176 A1 (岸本忠三) 1996. 12. 05, 全文 & AU 9657796 A & JP 9-104629 A & EP 841068 A1 & US 6034235 A	1-7



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 371 664 A1**

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:
17.12.2003 Bulletin 2003/51

(21) Application number: 02708646.1

(22) Date of filing: 22.03.2002

(51) Int Cl.7: **C07K 14/82, A61K 38/00,
A61K 39/00, A61P 35/00,
C07K 7/04, C12N 5/06**

(86) International application number:
PCT/JP02/02794

(87) International publication number:
WO 02/079253 (10.10.2002 Gazette 2002/41)

(84) Designated Contracting States:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**
Designated Extension States:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: 22.03.2001 JP 2001083250

(71) Applicant: **Sugiyama, Haruo**
Mino-shi, Osaka 562-0036 (JP)

(72) Inventor: **Sugiyama, Haruo**
Mino-shi, Osaka 562-0036 (JP)

(74) Representative: **Harding, Charles Thomas et al**
D. Young & Co.
21 New Fetter Lane
London EC4A 1DA (GB)

(54) **WTI MODIFIED PEPTIDE**

(57) The present invention discloses a cancer antigen peptide comprising the following amino acid sequence: Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (Sequence ID No. 3), a cancer vaccine having this for its

active ingredient, and a DNA vaccine having for its active ingredient DNA that codes for this peptide.

EP 1 371 664 A1

Description

Technical Field

[0001] The present invention relates to a cancer antigen based on the product of Wilms' tumor suppresser gene WT1. This cancer antigen is useful as an anticancer vaccine against cancers of the blood such as leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and malignant lymphoma, solid cancers such as gastric cancer, colon cancer, lung cancer, breast cancer, germinal cell cancer, liver cancer, skin cancer, bladder cancer, prostate cancer, uterine cancer, cervical carcinoma and ovarian cancer, as well as any cancer that expresses WT1.

Description of the Related Art

[0002] The immune mechanism for eliminating foreign objects from the body generally consists of humoral immunity, in which is involved macrophages that function as antigen-presenting cells that recognize an antigen, helper T-cells that activate other T-cells by recognizing antigens presented by said macrophages and producing various lymphokines, and B lymphocytes that differentiate into antibody-producing cells due to the action of said lymphokines; and, cellular immunity, by which killer T-cells (cytotoxic T-cells (CTL)), which have differentiated as a result of being presented with an antigen, attack and destroy target cells.

[0003] At present, cancer immunity is thought to mainly be the result of cellular immunity involving killer T-cells. In cancer immunity affected by killer T-cells, precursor T-cells, which have recognized cancer antigen presented in the form of a complex of major histocompatibility complex (MHC) class I (MHC class I antigen, also referred to as HLA antigen in the case of humans) and cancer antigen, differentiate and proliferate, and the resulting killer T-cells that have formed attack and destroy the cancer cells. At this time, the cancer cells present a complex of MHC class I antigen and cancer antigen on their cell surface, and this is targeted by the killer T-cells (Cur. Opin. Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995).

[0004] The aforementioned cancer antigen presented by MHC class I antigen on the cancer cells serving as the target cells is thought to be a peptide composed of about 8-12 amino acids formed as a result of antigen protein synthesized within cancer cells being processed by intracellular protease (Cur. Opin. Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995).

[0005] At present, although searches have been conducted for antigen proteins for various cancers, few have been verified to be cancer-specific antigens.

[0006] The tumor suppresser gene WT1 of Wilms tumor (WT1 gene) has been isolated from chromosome 11p13 as one of the causative genes of Wilms tumor based on analysis of the WAGR syndrome that occurs as a complication of Wilms tumor, aniridia, urogenital abnormalities, mental retardation and so forth (Gessler, M., et al., Nature, Vol. 343, p. 774-778 (1990)). Its genomic DNA is about 50 kb and is composed of 10 exons, while its cDNA is about 3 kb. The amino acid sequence estimated from cDNA is as shown in Sequence ID No. 1 (Mol. Cell. Biol., 11, 1707, 1991).

[0007] The WT1 gene is expressed with high frequency in human leukemia, and when leukemia cells are treated with WT1 antisense oligomer, the growth of the cells is inhibited (Japanese Unexamined Patent Publication No. 9-104627). Thus, WT1 gene is thought to act to promote the growth of leukemia cells. Moreover, WT1 is also highly expressed in solid cancers such as gastric cancer, colon cancer, lung cancer, breast cancer, germinal cell cancer, liver cancer, skin cancer, bladder cancer, prostate cancer, uterine cancer, cervical carcinoma and ovarian cancer (Japanese Patent Application No. 9-191635), and the WT1 gene has been demonstrated to be a novel tumor marker in leukemia and solid cancers.

[0008] Several cancer-specific antigen peptides consisting of a portion of the WT1 gene expression product are described in WO 00/06602, one particularly promising peptide is designated as D^b, and the following amino acid sequence: Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (Sequence ID No. 2) (referred to as "WT1 wild peptide" in the present invention) is described therein.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

[0009] Thus, an object of the present invention is to provide a peptide that is promising as a cancer vaccine and which has higher activity than previously known cancer-specific antigen peptides.

[0010] As a result of earnestly conducting various studies to solve the above problems, the inventors of the present invention found that a peptide (referred to as "WT1 modified peptide") having an amino acid sequence in which the second amino acid Met of the aforementioned known amino acid sequence (Sequence ID No. 2) is changed to Tyr, namely Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (Sequence ID No. 3), has higher activity, thereby leading to completion of the present invention.

[0011] Thus, the present invention provides a peptide (WT1 modified peptide) consisting of 9-30 amino acids and

comprising the following amino acid sequence: Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (Sequence ID No. 3). This peptide is preferably a polypeptide consisting of 9-12 amino acids and comprising the amino acid sequence indicated in Sequence ID No. 3 and, more preferably, a peptide consisting of the amino acid sequence indicated in Sequence ID No. 3.

[0012] Moreover, the present invention provides a cancer vaccine having for its active ingredient the aforementioned WT1 modified peptide.

[0013] Moreover, the present invention also provides a DNA vaccine against cancer having for its active ingredient DNA coding for the aforementioned peptide.

[0014] In addition, the present invention provides antigen-presenting cells on which presented a complex of HLA antigen (MHC class I antigen) and the aforementioned peptide.

[0015] Moreover, the present invention also provides cytotoxic T-cells that recognize a complex of HLA antigen and the aforementioned peptide.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0016]

Fig. 1 is a graph showing the cell killing effects (specific cytolytic activity) on C1R2402 target cells (T), either pulsed or not pulsed with peptide, by effector cells (E) stimulated with WT1 wild peptide (Sequence ID No. 2) or the WT1 modified peptide of the present invention (Sequence ID No. 3). In the graph, the black circles indicate the cytolytic effect on C1R2402 target cells pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 modified peptide, the black squares indicate the cytolytic effect on C1R2404 target cells pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 wild peptide, the white circles indicate the cytolytic effect on C1R2402 target cells not pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 modified peptide, and the white squares indicate the cytolytic effect on C1R2402 target cells not pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 wild peptide.

Fig. 2 is a graph showing the cytolytic activity on acute myelocytic leukemia cells endogenously expressing WT1 antigen or on acute myelocytic leukemia cells not expressing WT1 antigen by effector cells stimulated with WT1 wild peptide or the WT1 modified peptide of the present invention.

Fig. 3 is a graph showing the cell killing effects (specific cytolytic activity) on C1R2402 target cells, either pulsed or not pulsed with peptide, by effector cells stimulated with WT1 wild peptide or the WT1 modified peptide of the present invention. In the graph, the black circles indicate the cytolytic effect on C1R2402 cells pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 modified peptide, the black squares indicate the cytolytic effect on C1R2402 target cells pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 wild peptide, the white circles indicate the cytolytic effect on C1R2402 target cells not pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 modified peptide, and the white squares indicate the cytolytic effect on C1R2402 target cells not pulsed with wild peptide by effector cells stimulated with WT1 wild peptide.

Fig. 4 is a graph showing the cytolytic activity on lung cancer cell lines endogenously expressing WT1 or not expressing WT1 by effector cells stimulated with WT1 wild peptide or the WT1 modified peptide of the present invention.

Fig. 5 is a graph showing the inhibitory effects of anti-HLA class I antibody, anti-HLA class II antibody and anti-CD8 antibody on the cell killing effects (specific cytolytic activity) on C1R2402 target cells pulsed with wild peptide by effector cells stimulated by WT1 wild peptide or the WT1 modified peptide of the present invention.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0017] The peptide of the present invention is a peptide consisting of 9-30 amino acids that comprises the amino acid sequence consisting of the 9 amino acids shown in Sequence ID No. 3. Moreover, from the viewpoint of being presented by binding to HLA antigen, the peptide is preferably a peptide consisting of 9-12 amino acids that comprises the amino acid sequence shown in Sequence ID No. 3 and, more preferably, is a peptide having rules (motifs) in the sequence of antigen peptide presented by binding to HLA antigen at that time (J. Immunol., 152, p. 3913, 1994; Immunogenetics, 41, p. 178, 1995; J. Immunol., 155, p. 4307, 1994; J. Immunol., 155, p. 4749, 1995). Moreover, the peptide is most preferably a peptide consisting of an amino acid sequence of the 9 amino acids shown in Sequence ID No. 3.

[0018] Furthermore, the aforementioned "peptide comprising the amino acid sequence shown in Sequence ID No. 3" is specifically, for example, a peptide comprising the amino acid sequence shown in Sequence ID No. 3 and extending in the direction of the N-terminal and/or the direction of the C-terminal from the applicable position on WT1 (Sequence ID No. 1) (position nos. 235-243) or from the corresponding position on human WT1 (NCBI Database Accession No. XP012009), that has activity as a cancer antigen peptide.

[0019] An example of a method for measuring the activity of the cancer antigen peptide of the present invention is

the method described in J. Immunol., 154, p. 2257, 1995. The following provides an explanation of an outline of this method using the case of the type of HLA being HLA-A24 as an example. First, peripheral blood lymphocytes are isolated from a person positive for HLA-A24 antigen. Next, by stimulating the peripheral blood lymphocytes by adding the peptide of the present invention in vitro, CTL (cytotoxic T-cells) are induced that specifically recognize the complex

5 of the peptide of the present invention and HLA-A24 presented by the antigen-presenting cells.
 [0020] This induction of CTL can be investigated by, for example, measuring the amounts of various cytokines (e. g., IFN- γ) produced by the CTL by reacting with the complex of antigen peptide and HLA-A24. In addition, induction of CTL can also be investigated by a method in which the cytotoxicity of the CTL is measured with respect to antigen peptide-presenting cells labeled with ^{51}Cr or Europium (^{51}Cr Release Assay, Int. J. Cancer, 58, p. 317, 1994; Europium Release Assay, J. Immunol., 154, p. 3991, 1995). Moreover, induction of CTL can also be investigated by referring to the examples described later.

10 [0021] The present invention also relates to a cancer vaccine that has the aforementioned antigen as its active ingredient. This vaccine can be used for the prevention or treatment of cancers of the blood such as leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and malignant lymphoma, as well as solid cancers such as gastric cancer, colon cancer, lung cancer, breast cancer, germinal cell cancer, liver cancer, skin cancer, bladder cancer, prostate cancer, uterine cancer, cervical carcinoma and ovarian cancer. In particular, this vaccine can be applied to patients positive for HLA-A24. This vaccine can be administered orally or parenterally by for example, intraperitoneal, subcutaneous, intracutaneous, intramuscular, intravenous or intranasal administration.

15 [0022] Moreover, administration of the vaccine of the present invention can also be carried out by a method in which monocytes are collected from the peripheral blood of a patient, dendritic cells are extracted from the monocytes, the dendritic cells are pulsed with the peptide of the present invention and then returned to the patient by subcutaneous administration and so forth.

[0023] This method is referred to as cytotherapy or dendritic cell (DC) therapy, and the section entitled "Antigen-Presenting Cells" described later should be referred to for further details.

25 [0024] The vaccine, in addition to the peptide administered as the aforementioned active ingredient, may also contain pharmaceutically allowable carriers such as a suitable adjuvant (Clin-Microbiol. Rev., 7, 277-289, 1994), examples of which include a mineral gel like aluminum hydroxide, a surfactant like phosphorous lecithin and a pluronic polyole, a polyanion, a peptide and an oily emulsion. Alternatively, the vaccine may contain other aggregates mixed into liposomes or blended into polysaccharide or the vaccine. The dosage is typically 0.1 $\mu\text{g/kg}$ to 1 mg/kg per day.

30 [0025] In the present invention, DNA that codes the aforementioned polypeptide vaccine can also be used as a vaccine (DNA vaccine). Namely, after inserting nucleic acids, and preferably DNA, that contain nucleic acids that encode the WT1 modified peptide of the present invention into a suitable vector, and preferably an expression vector, cancer immunity can be imparted by administering the vector to an animal. WO 00/6602 or J. Immunol., 160, p. 1717, 1998 and so forth should be referred to for the specific technique used for this DNA vaccine.

35 [0026] In addition, the present invention relates to antigen-presenting cells on which a complex of HLA antigen and the aforementioned peptide is presented. In this example, although potent cell killing activity is observed due to stimulation with the peptide of the present invention, this is the result of the presence of antigen-presenting cells, on which a complex of the peptide of the present invention and HLA antigen (HLA-A24 antigen) is presented, within peripheral blood monocytes, and of the induction of CTL (cytotoxic T-cells) that specifically recognize these antigen-presenting cells. These antigen-presenting cells on which a complex of HLA antigen and the peptide of the present invention is presented are used effectively in cytotherapy (DC therapy) as described below.

40 [0027] The antigen-presenting cells used in cytotherapy are produced by isolating cells having the ability to present antigen from tumor patients, pulsing these cells with peptide of the present invention outside the body, and causing a complex of HLA antigen and the peptide of the present invention to be presented on the surface of the cells. Here, although there are no particular restrictions on the "cells having the ability to present antigen" provided they are cells that express HLA antigen capable of presenting the peptide of the present invention on the surface of the cells, dendritic cells are preferable since they are considered to have high antigen-presenting ability.

45 [0028] In addition, the peptide of the present invention that is used to pulse the aforementioned cells having the ability to present antigen may not only be in the form of a peptide, but rather may also be in the form of DNA or RNA that encodes said peptide.

50 [0029] A specific method for preparing the antigen-presenting cells of the present invention can be referred to in, for example, Cancer Immunol. Immunother., 46, 82, 1998, J. Immunol., 158, p. 1796, 1997, and Cancer Res., 59, p. 1184, 1999. In the case of using dendritic cells, lymphocytes are isolated from the peripheral blood of a tumor patients using the Fycoll method, and after subsequently removing the non-adhered cells, dendritic cells are derived from the adhered cells by culturing in the presence of GM-CSF and IL-4, after which the antigen-presenting cells of the present invention can be prepared by pulsing the dendritic cells by culturing with the peptide of the present invention.

55 [0030] In addition, in the case of preparing the antigen-presenting cells of the present invention by inserting DNA or RNA encoding the peptide of the present invention into the aforementioned cells having the ability to present antigen,

insertion can be carried out by referring to, for example, Cancer Res., 56, p. 5672, 1996 or J. Immunol., 161, p. 5607, 1998 in the case of DNA, or by referring to J. Exp. Med., 184, p. 465, 1996 in the case of RNA.

[0031] These antigen-presenting cells can be used as the active ingredient of a tumor therapeutic agent. At that time, in order to maintain the stability of the antigen-presenting cells, the treatment agent preferably comprises physiological saline, phosphate-buffered saline (PBS) or medium and so forth. Examples of administration methods include intra-

venous administration, subcutaneous administration and intracutaneous administration.

[0032] Moreover, the present invention also relates to cytotoxic T-cells (CTL) that recognize a complex of HLA antigen and the aforementioned peptide. The CTL of the present invention can be effectively used in the adoptive immuno-

therapy described below.

[0033] Namely, in the case of melanoma, adoptive immunotherapy has been recognized to be therapeutically effective by culturing a large number of the patient's T-cells that have invaded the tumor in vitro, and then returning them to the patient (J. Natl. Cancer Inst., 86, 1159, 1994). In addition, in the case of mouse melanoma, inhibition of metastasis has been observed by stimulating spleen cells in vitro with tumor antigen peptide TRP-2, allowing specific CTL to proliferate in the tumor antigen peptide, and then administering said CTL to melanoma-transplanted mice (J. Exp. Med., 185, 453, 1997). This is based on the result of allowing CTL to proliferate in vitro that specifically recognize a complex of the HLA antigen of antigen-presenting cells and tumor antigen peptide. Thus, a treatment method in which patient peripheral blood lymphocytes are stimulated in vitro using the peptide of the present invention to increase tumor-specific CTL followed by returning these cells to the patient is thought to be useful.

[0034] In this manner, the CTL of the present invention can be used as the active ingredient of a tumor therapeutic agent. At that time, in order to maintain the stability of the CTL, the therapeutic agent preferably comprises physiological saline, phosphate-buffered saline (PBS) or medium and so forth. Examples of administration methods include intra-

venous administration, subcutaneous administration and intracutaneous administration.

[0035] The following examples serve to clarify the usefulness of the peptide of the present invention as a cancer antigen and cancer vaccine.

Example 1

[0036] Peripheral blood mononuclear cells were isolated from HLA-A*2402-positive donors and distributed among the wells of a 24-well plate at 2×10^6 cells/well followed by the addition of WT1 wild peptide or WT1 modified peptide to a concentration of 20 μ M and culturing for 1 week. The medium used at this time consisted of 45% RPMI, 45% AIV, 10% FCS 1x non-essential amino acids and SM/PCG. Following the aforementioned culturing, the cells were adjusted to 2×10^6 cells/well and used as responder cells.

[0037] On the other hand, other peripheral blood mononuclear cells were similarly isolated from the same HLA-A*2402-positive donors and then peptide-pulsed by culturing for 4 days with one of the aforementioned peptides at 20 μ M. After then irradiating at 30 Gy, the cells were adjusted to 4×10^6 cells/well and used as stimulator cells.

[0038] The responder cells and stimulator cells prepared in the manner described above were then mixed and then cultured for 1 week following the addition of IL-2 at 50 U/ml. As a result, the status of the resulting cells were as shown in the following table.

Table 1

Peptide	No. of cells	CD4	CD8
WT1 wild peptide	2.4×10^6 /well	5%	35%
WT1 modified peptide	3.0×10^6 /well	18%	38%

[0039] Next, a killing assay was carried out in accordance with ^{51}Cr release method (J. Immunol., 164, 1873, 2000). C1R2402 cells and C1R2402 cells pulsed with the aforementioned peptides were used for the target cells. Cells stimulated by WT1 wild peptide or WT1 modified peptide as previously described (effector cells (E)) were then allowed to act on each of these target cells (T) at an E:T ratio of 1, 5 or 20, followed by measurement of cell lysis. Those results are shown in Fig. 1. As is clear from this graph, cells stimulated with WT1 modified peptide exhibited a more potent cell killing activity than cells stimulated with WT1 wild peptide.

Example 2

[0040] The cell killing activity of effector cells stimulated with WT1 wild peptide or WT1 modified peptide on leukemia cells that endogenously express WT1 antigen was tested according to the ^{51}Cr release method. WT1+/A*2402+ cells (leukemia cells from AML patient #1), WT1-/A*2402+ cells (leukemia cells from AML patient #2), WT1+/A*2402- cells

(leukemia cells from AML patient #3) and WT1-/A*2402- cells (leukemia cells from AML patient #4) were used for the target cells.

[0041] The effector cells (E) prepared in Example 1 and the aforementioned target cells (T) were mixed at an E:T ratio of 20:1 and cultured for 4 hours followed by measurement of the degree of cell lysis. Those results are shown in Fig. 2.

[0042] As is clear from this graph, although both the cells stimulated with WT1 wild peptide or WT1 modified peptide demonstrated cytotoxic activity on the WT1+/A*2402 cells, the level of that activity was higher for the WT1 modified peptide.

Example 3

[0043] The same experiment as Example 1 was carried out using effector cells prepared from peripheral blood mononuclear cells of different healthy donors positive for HLA-A*2402. Those results are shown in Fig. 3.

[0044] As is clear from this graph, similar to Example 1, cells stimulated with WT1 modified peptide exhibited a more potent cytotoxic activity than cells stimulated with WT1 wild peptide.

Example 4

[0045] The cytotoxic activity of effector cells stimulated with WT1 wild peptide or WT1 modified peptide was tested on a cancer cell line associated with lung cancer that endogenously expresses WT1 antigen (target cells) using the ⁵¹Cr release method. RERF-LCAI (WT1+/A*2402+), LC1sq (WT1+/A*2402+), 11-18 (WT1-/A*2402+) and LK87 (WT1+/A*2402-) cells were used for the target cells.

[0046] Effector cells (E) prepared in the same manner as Example 1 and the aforementioned target cells (T) labeled with ⁵¹Cr were cultured for 4 hours at an E:T ratio of 20:1 in the same manner as Example 2 followed by measurement of the degree of cell lysis. Those results are shown in Fig. 4.

[0047] As is clear from this graph, although both the cells stimulated with WT1 wild peptide or WT1 modified peptide demonstrated cytotoxic activity only on the WT1+/A*2402+ cells, the level of that activity was higher for WT1 modified peptide.

Example 5

[0048] Effector cells stimulated with WT1 wild peptide or WT1 modified peptide were confirmed to be CD8-positive killer cells that bind to HLA class I by a blocking assay using antibody. The antibodies used consisted of anti-HLA class I antibody, anti-HLA class II antibody and anti-CD8 antibody. Effector cells (E) prepared in the same manner as Example 1 and target cells (T) in the form of C1R2402 cells or C1R2402 cells pulsed with WT1 wild peptide, both labeled with ⁵¹Cr, were mixed with antibody at an E:T ratio of 20:1 and then cultured for 4 hours followed by measurement of the degree of cell lysis according to the ⁵¹Cr release method. Those results are shown in Fig. 5.

[0049] As is clear from this graph, cytotoxic activity was blocked by anti-HLA class I antibody and anti-CD8 antibody for both the cells stimulated with WT1 wild peptide or WT1 modified peptide, indicating that the cells that exhibit cytotoxic activity are CD8-positive killer cells that bind to HLA class I.

Example 6

[0050] The binding affinity of WT1 modified peptide and WT1 wild peptide to HLA-A*2402 was investigated. After treating C1RA2402 cells for 1 minute with a buffer solution (131 mM citric acid, 66 mM sodium phosphate, 290 m osmol, pH 3.3), the cells were neutralized by adding DMEM medium comprising 0.5% bovine serum albumin. After washing the cells with the medium, they were suspended at a concentration of 2×10^6 cells/ml in DMEM medium containing 200 nM β 2-microglobulin (Sigma) and 0.5% bovine serum albumin. 15 μ l of the cell suspension were mixed with 50 μ l of the medium comprising various concentrations of WT1 peptide followed by incubating for 4 hours at room temperature. After washing the cells, they were stained with monoclonal antibody to HLA-A24 labeled with FITC (clone name: 7A12), and the amount of HLA-A24 expressed was analyzed with a flow cytometer FACS system. A similar procedure was performed on the antigen peptide of melanoma antigen pmel 15, which has been reported to bind to HLA-A*2402 (Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu) (Sequence ID No. 4) (J. Immunol., 154, 5994, 1995), and using this as a standard, the dissociation constants (Kd) of the WT1 peptides were calculated according to the method described in the literature (Immunogenetics, 51, 816, 2000). These results are shown in Table 2.

Table 2

Peptide	Dissociation constant Kd (M)
WT1 wild peptide	1.82×10^{-5}
WT1 modified peptide	6.40×10^{-7}

[0051] As is clear from this table, WT1 modified peptide demonstrated stronger binding affinity for HLA-A*2402 than the WT1 wild peptide.

[0052] On the basis of the aforementioned results, the peptide of the present invention was proven to unquestionably function as a cancer antigen, and cause the induction and proliferation of killer T-cells (cancer cell cytotoxic T-cells) against cancer cells. Thus, the cancer antigen peptide of the present invention is useful as a cancer vaccine against leukemia and solid cancers accompanying an increased expression of the WT1 gene.

SEQUENCE LISTING

<110> Haruo Sugiyama
 5 <120> WT1 modified peptide
 <130> J939
 <150> JP 2001-83250
 10 <151> 2001-03-22
 <160> 4
 <210> 1
 15 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 1
 20 Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Ser
 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro Val Ser Gly Ala
 25 20 25 30
 Arg Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala
 35 40 45
 Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 30 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 35 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 40 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Thr Ile
 45 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe
 50 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 55

EP 1 371 664 A1

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 5 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 10 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu
 15 260 265 270
 Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 20 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 25 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 30 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 35 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 40 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 45 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu His Val Ala
 435 440 445
 Leu
 50 449
 <210> 2
 <211> 9
 55 <212> PRT

5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 2
 10 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 20 <223> Synthetic Peptide
 <400> 3
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 25 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 35 <222>
 <223> Antigenic Peptide
 <400> 4
 40 Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu
 1 5

45 **Claims**

1. A cancer antigen peptide having for its active ingredient a peptide consisting of 9-30 amino acids and comprising the following amino acid sequence: Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (Sequence ID No. 3).
- 50 2. A cancer antigen peptide according to claim 1 that is consisted of 9-12 amino acids and comprises the amino acid sequence indicated in Sequence ID No. 3.
3. A cancer antigen peptide according to claim 1 that is consisted of the amino acid sequence indicated in Sequence ID No. 3.
- 55 4. A cancer vaccine having for its active ingredient a peptide according to any of claims 1. through 3.
5. A DNA vaccine against cancer having for its active ingredient DNA that codes for a peptide according to any of

claims 1 through 3.

6. Antigen-presenting cells on which are presented a complex of HLA antigen and a peptide according to any of claims 1 through 3.

7. Cytotoxic T-cells that recognize a complex of HLA antigen and a peptide according to any of claims 1 through 3.

10

15

20

25

30

35

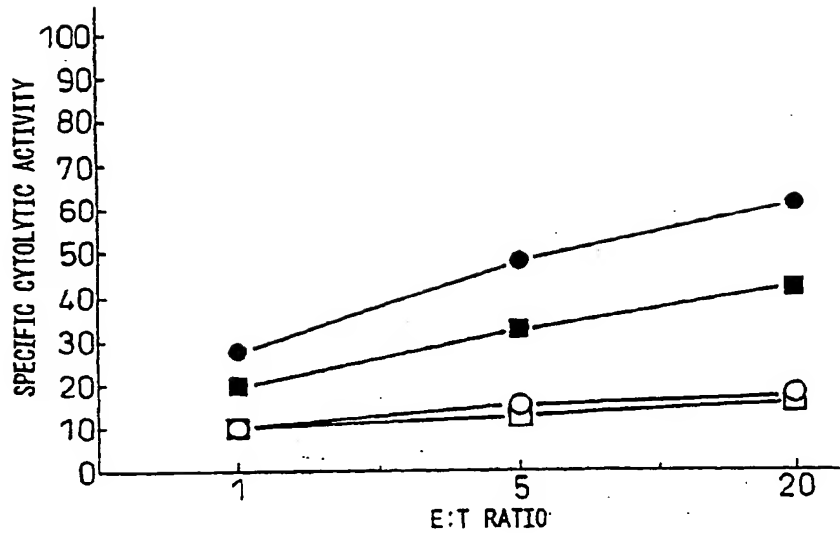
40

45

50

55

Fig.1



- [EFFECTER CELLS STIMULATED WITH WT1 MODIFIED PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS PULSED WITH WILD PEPTIDE
- [EFFECTER CELLS STIMULATED WITH WT1 WILD PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS PULSED WITH WILD PEPTIDE
- [EFFECTER CELLS STIMULATED WITH WT1 MODIFIED PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS NOT PULSED WITH WILD PEPTIDE
- [EFFECTER CELLS STIMULATED WITH WT1 WILD PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS NOT PULSED WITH WILD PEPTIDE

Fig.2

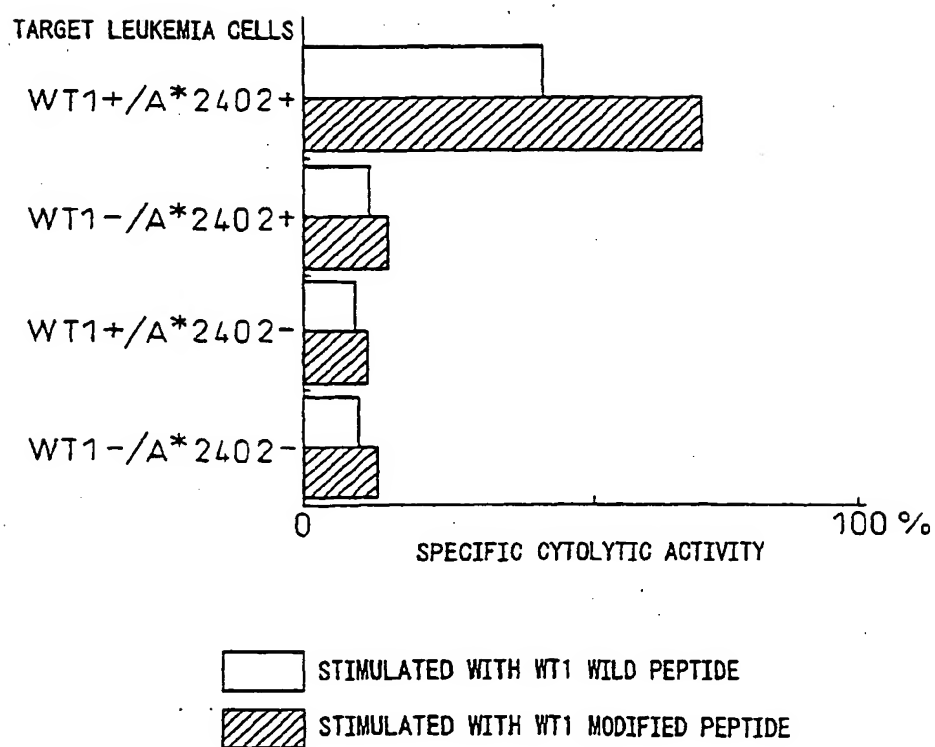
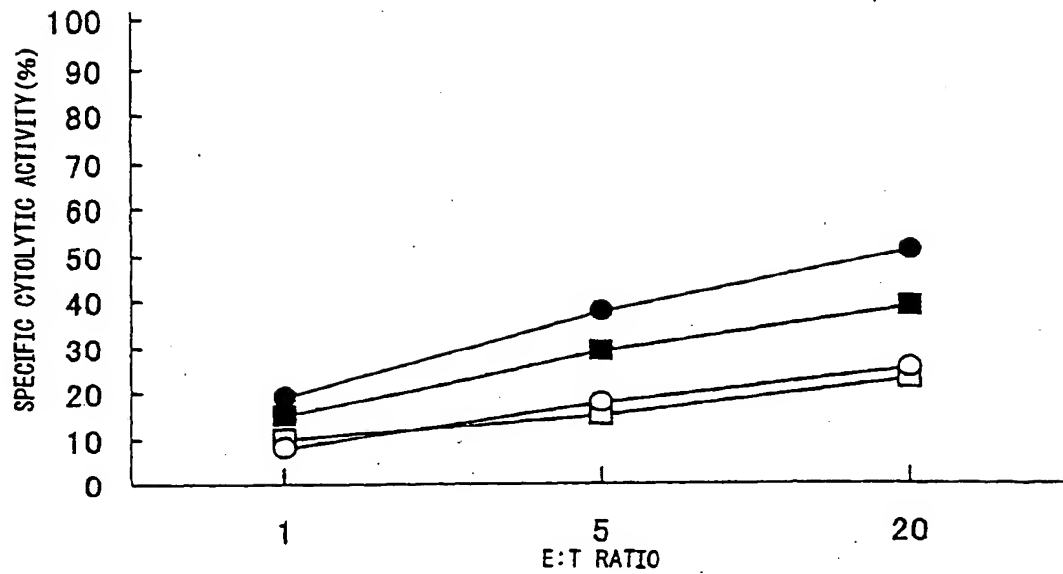


Fig.3



- EFFECTOR CELLS STIMULATED WITH WT1 MODIFIED PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS PULSED WITH WILD PEPTIDE
- EFFECTOR CELLS STIMULATED WITH WT1 WILD PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS PULSED WITH WILD PEPTIDE
- EFFECTOR CELLS STIMULATED WITH WT1 MODIFIED PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS NOT PULSED WITH WILD PEPTIDE
- EFFECTOR CELLS STIMULATED WITH WT1 WILD PEPTIDE
C1R2402 TARGET CELLS NOT PULSED WITH WILD PEPTIDE

Fig.4

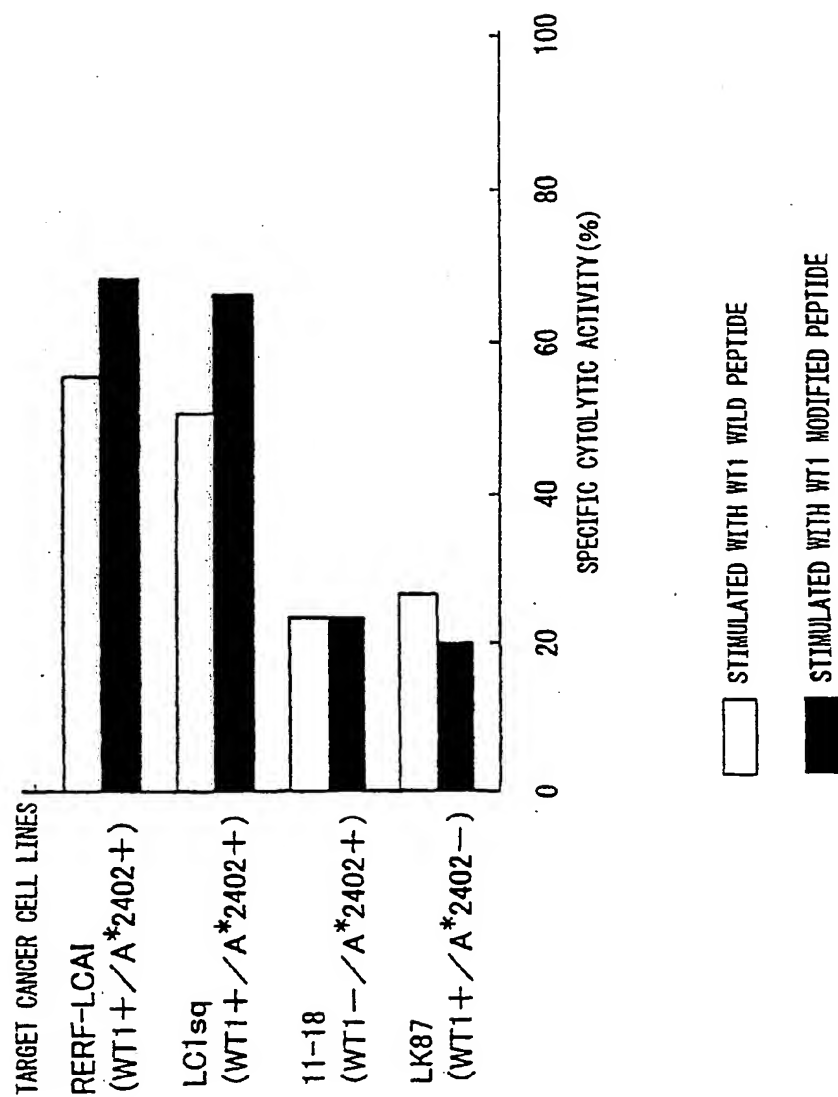
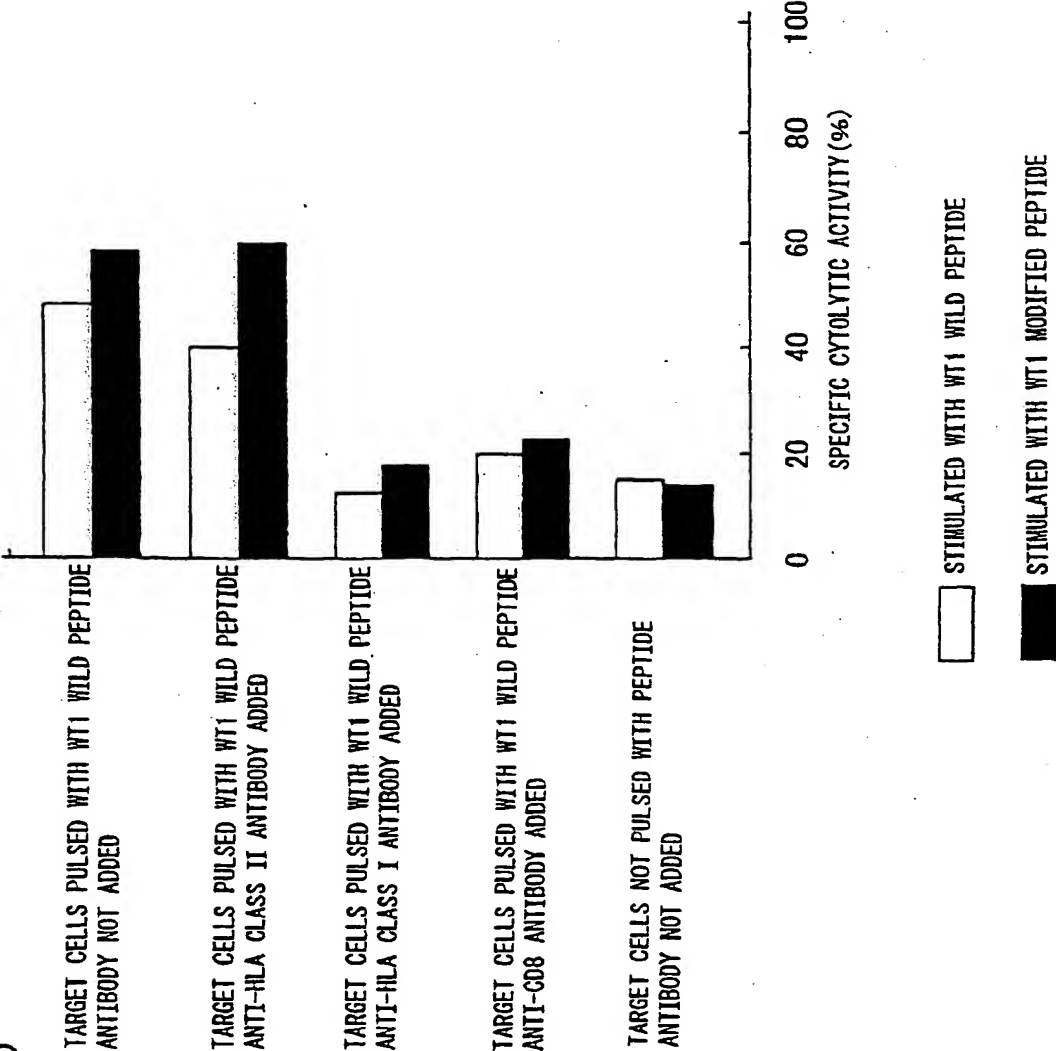


Fig.5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C07K14/82, A61K38/00, A61K39/00, A61P35/00, C07K7/04, C12N5/06 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C07K14/82, C07K7/04, C12N5/06, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 00/26249 A1 (Imperial College Innovations Ltd.), 11 May, 2000 (11.05.00), Claims & AU 9964797 A & EP 1127068 A1	7 1-6
X A	WO 00/18795 A2 (Corixa Corp.), 06 April, 2000 (06.04.00), Claims & AU 9964078 A & EP 1117687 A2 & BR 9914116 A & CN 1336935 A & NO 200101613 A & KR 2001085861 A & HU 200103598 A2	7 1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 June, 2002 (14.06.02)		Date of mailing of the international search report 25 June, 2002 (25.06.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02794

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/06602 A1 (Haruo SUGIYAMA), 10 February, 2000 (10.02.00), Full text & AU 9949321 A & BR-9912663 A & EP 1103564 A1 & JP 2000-562398 A & CN 1314916 A & KR 2001072112 A	1-7
A	OKA, Y. et al., Cancer Immunotherapy Targeting Wilms' Tumor Gene WT1 Product, J.Immunol. (2000) Vol.164, pages 1873 to 1880	1-7
A	Keiko TADOKORO, "Gan Yokusei Idenshi WT1 no Kino Hatsugen", Gendai Kagaku extra issue 33 "Gan Idenshi Kenkyu no Tenbo II" (1997), pages 92 to 98	1-7
A	WO 96/38176 A1 (Chuzo KISHIMOTO), 05 December, 1996 (05.12.96), Full text & AU 9657796 A & JP 9-104629 A & EP 841068 A1 & US 6034235 A	1-7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)